

Posudek na diplomovou práci

Bc. Helena Huspeková, 2014: Studium vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato na chování klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 46 stran.

Tato diplomová práce byla zpracovaná na zajímavé téma: vliv infekce na chování přenašeče. Jako modelový organismus byla zvolena *Borrelia burgdorferi* a *Ixodes ricinus*. Autorka přitom vycházela ze 6 studií zabývajících se podobnou tematikou, které vyšly v rozmezí let 1935 až 2013. Téma je to tedy stále velmi aktuální, i když málo prozkoumané, což dávalo autorce šanci získat poměrně unikátní výsledky.

Úvod/Literární přehled

Na 14 stranách autorka shrnuje základní poznatky o modelových organismech, přičemž se ponejvíce zaměřuje na lymfskou boreliózu, její klinické příznaky a epidemiologii. Literární údaje vztahující se k tématu (předposlední kapitola) jsou shrnuty na pouhých 4 stranách, což je zřejmě dáno nedostatkem literatury na toto téma. Nicméně autorka zcela zbytečně tuto kapitolu dělí na další podkapitoly. V literárním přehledu mi chybí detailnější kapitola o chování a fyziologii klíštěte a podrobnější informace o interakci borelií se střevem přenašeče. Celkově je literární přehled napsán poměrně čtivě, i přes drobné stylistické chyby; obsahuje přiměřený počet obrazových příloh a tabulek, které vhodně doplňují text. Přehled však vykazuje poměrně závažné nedostatky v práci s citacemi. Některé kapitoly jsou založené na pouhých 3-5 citacích a v některých odstavcích citace chybí úplně. Většina odstavců je pak doložena pouze jednou či dvěma citacemi, což naznačuje neschopnost autorky syntetizovat informace z více zdrojů.

- „Plně nasáté klíště následně odpadne a vyvine se ve vyšší vývojový stupeň.“ V tomto případě je vhodnější použít termín vývojové stadium.
- kapitola 2.2.1 – je zbytečné uvádět tyto informace v samostatné kapitole, dají se zařadit do kapitoly 2.3 (klinické projevy infekce)
- „Celkové počty nálezů klíšťovou encefalitidou jsou za rok podstatně nižší, což můžeme přičítat již určité míře proočkování obyvatelstva České republiky.“ Tato informace však z příložených tabulek nevyplývá.
- Otázka: Jaký je názor autorky na výhodnost/nevýhodnost většího množství tuku v těle infikovaných klíšťat z pohledu přenosu borelií? Citováním toho samého zdroje dochází ke dvěma různým závěrům – infikované klíště není tak náchylné k dehydrataci, takže může strávit více času hledáním hostitele a tím zvýšit šanci přenosu borelií; na druhou stranu o pár řádků níže autorka tvrdí, že infikovaná klíšťata jsou méně aktivní, což by naopak snižovalo pravděpodobnost přenosu borelií na obratlovčího hostitele.
- Otázka: Vzhledem k obsahu poslední kapitoly bych zvolila obecnější název, protože jsou zde zmíněni nejen přenašeči, ale i mezipřenašeči a definitivní hostitelé. Podle jakých kritérií autorka vybírala uvedené příklady?

Cíle práce jsou definované ve třech bodech, přičemž pouze první bod se týká experimentální práce (a byl splněn). Druhé dva body jsou spíše otázkou diskuze získaných výsledků. Druhý cíl (Zhodnocení možnosti využití výsledků experimentů a zjištěných informací o chování klíšťat pro prevenci přenosu klíštěte v jeho přirozených podmínkách) je řešen v rámci kapitoly diskuze v předposledním odstavci pouhými dvěma větami. Třetí cíl (Zhodnocení možnosti využití

zjištěných výsledků pro prevenci před získáním Lymeské boreliózy) není v diskuzi řešen vůbec.

Materiál a metodika jsou podané na 5 stranách. Autorka se během práce seznámila s metodou počítání borelií, s manipulací modelových organismů a s designem behaviorálních testů. V této kapitole postrádám zejména metodiku PCR pro vyhodnocení nakaženosti nymf a dospělců. Experimenty prováděné v aréně by bylo vhodné doplnit fotografiemi.

- 4.1.1 Proč byly pro pokusy vybrány myši kmene C3H?
- 4.1.3.1 Je uvedena metoda standardem pro počítání borelií? Dá se k počítání borelií použít Burkerova komůrka?
- 4.3 „Všechny nymfy byly boreliemi prokazatelně a dostatečně infikovány.“ – kolik nymf se testovalo, jaké byly podmínky PCR a co znamená výraz „dostatečně infikovány“?
- 4.5.2 a 4.5.3 Proč se rychlost přísátí nymf a dospělců sledovala v jiných časových intervalech?
- 4.5.3 a 4.5.4 Byla zaznamenána váha klíšťat před nasátím? Ovlivňuje infekce boreliemi startovní váhu nymfy před nasátím? Např. již zmiňovaným vyšším ukládáním tuku?
- 4.5.5 dřevěná tyčka byla umístěna horizontálně nebo vertikálně? Toto zde chybí a je to zmíněno až v diskuzi.
- 4.5.7 a 4.5.8 Z jakého důvodu byla startovní pozice klíšťat na pomezí světla a stínu a proč byla zvolena právě 1 hodina k odečtení výsledku? Byl zaznamenáván pohyb klíštěte během této hodiny, jestli strávilo více času na světle nebo ve stínu? Ovlivnilo by výsledkem testování klíšťat individuálně místo ve skupinách? Jak by se chovala skupina klíšťat namíchaná z infikovaných a kontrolních jedinců?

Výsledky experimentů jsou přehledně zpracované na 8 stranách a doplněny řádně popsány grafy. Kapitola výsledky je netradičně označena jako 4.6 a výsledky jsou v této kapitole zároveň i částečně diskutovány, což rovněž nebývá běžné. V několika případech chybí u výsledků získané hodnoty a k dispozici není ani příslušný graf, pouze je konstatován výsledek statistické analýzy. Průměrné hodnoty by bylo vhodné doplnit hodnotou směrodatné odchylky či rozptylem hodnot.

- 4.6.3 a 4.6.4 Čím si autorka vysvětluje vyšší hmotnost infikovaných klíšťat? Jak by svou hypotézu otestovala? Opět není uvedeno, jak dlouho klíšťata z jednotlivých skupin sála, pouze je konstatován výsledek statistické analýzy, že mezi skupinami nebyl signifikantní rozdíl.
- 4.6.6, 4.6.7, 4.6.8 Co by tento výsledek znamenal pro borelie - výhodu či nevýhodu?

V kapitole **diskuze** se opakují chyby v citování, především pak že některé odstavce/informace jsou zcela bez citace. Na kapitolu diskuze navazuje jednostránkové **shrnutí** získaných výsledků, kde autorka v jednotlivých bodech přehledně podává nejdůležitější výsledky své diplomové práce.

- „Nymfy nejspíše nedosáhnou této hraniční hodnoty, a proto zůstává jejich aktivita nezměněna.“ „Zde může být příčinou již zmíněná krátká doba, po kterou jsou nymfy infikovány, neboť míra borelií v jejich těle je natolik nízká, že k žádnému zásadnímu vlivu nedochází.“ V rozporu s těmito výroky jsou autorčiny výsledky, kde vliv borelií na chování nymf naopak prokázala – jak si to vysvětluje? Jak moc byla „její“ klíšťata nakažená v porovnání s uvedenou hraniční hodnotou?

Citovaná literatura obsahuje pouhých 45 citací. Autorka čerpala z časově širokého spektra článků, od velmi starých až po ty nejnovější.

Závěr:

Práce je zpracována na velmi zajímavé a aktuální téma, logicky uspořádaná, s kvalitní grafickou úpravou. Z cílů definovaných v diplomové práci považuji za splněny pouze první bod, kde autorka získala unikátní výsledky, jejichž význam pro preventivní opatření proti lymfské borelióze však není řádně diskutován. Zvolené metody by bylo vhodné doplnit aspoň údaji o nakaženosti testovaných klíšťat. Svým rozsahem a obsahem práce splňuje podmínky kladené na diplomovou práci, a proto ji doporučuji k obhajobě. Samotnou práci pak hodnotím stupněm velmi dobře až dobře.

V Praze dne 20. května 2014



RNDr. Iva Kolářová, Ph.D.



Oponentský posudek na magisterskou práci

Autorka: **Bc. Helena Huspeková**

Název práce: **Studium vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* sestru lato na chování klíštěte obecného *Ixodes ricinus***

V předkládané diplomové práci autorka shrnuje výsledky výzkumného projektu, ve kterém se snažila zjistit případný vliv infekce boreliemi na aktivitu a fyziologii infikovaných klíšťat (nymf a dospělců). Byly posuzovány následující parametry: rychlost přísátí, hmotnost po nasátí, rychlost vyhledávání hostitele, fototaktická aktivita.

Práce má celkem 46 stran a je členěna na kapitoly: Úvod, Přehled literatury, Cíle práce, Materiál a metody, Diskuze, Závěr a Použitá literatura. V těchto oddílech autorka popisuje a diskutuje získaná data formou vědeckého sdělení.

K práci mám následující připomínky a dotazy:

- V anotaci je uvedeno, že práce je v češtině, obr. 5 je však uveden včetně anglických popisků. (str. 13)
- Autorka uvádí, že dendritické buňky rozpoznávají antigen pomocí vazby na Toll-like receptory a rozpoznáný antigen následně transportují do lymfatických uzlin, kde je prezentován T lymfocytům. Toto tvrzení je poněkud zavádějící, jsou všechny antigeny rozpoznávány TLR? (str. 14)
- Autorka zmiňuje testování Salp 15 jako vakcíny proti boreliím, byl tento protein testován i jako vakcína proti klíšťatům? (str. 14)
- V rámci podkapitoly Vakcíny proti Lymeské borelióze autorka sice nepřímou radí k vakcinaci proti klíšťové encefalitidě, neuvádí však podrobnější informace o vakcínách proti borelióze. Existuje vakcína k veterinárnímu užití? Jaké jsou současné trendy ve vývoji vakcíny proti boreliím? (str. 14)
- Musí vakcíny využívající skrytých antigenů klíšťat nutně obsahovat extrakt z příslušné tkáně? (str. 15)
- Proč je odstavec na str. 21 odsazen na novou stránku?
- Proč byl pro studii vybrán druh *Borrelia afzelii* a proč tento fakt nereflektuje název práce? Myslí si autorka, že budou mít všechny druhy borelií na klíšťata stejný vliv? (str. 22)
- Borelie byly pěstovány bez použití ATB? (str. 23)
- Jaké množství borelií bylo použito k infekci myší? (str. 24)
- Na studium aktivity nymf a dospělců bylo použito 2 x 20 nymf a 2 x 20 dospělců, což mi přijde relativně málo, byl pokus opakován? Stejně tak v případě fototaktických testů, byl pokus opakován? (str. 26 a 27)
- Proč je podkapitola Výsledky začleněna do kapitoly Materiál a metody? (str. 28)
- Ve výsledkové podkapitole „Sledování rychlosti přísátí nymf“ autorka sice vysvětluje, proč nemusel být zaznamenán rozdíl mezi pokusnými skupinami (což jsou teze, které patří do diskuze nikoli do výsledků), ale neuvádí důležitou informaci, jaký byl průměrný čas nasátí? (str. 28)
- Na obr. 6 se na ose y (čas) objevují i záporné hodnoty, což je z hlediska testovaného kritéria „čas přísátí“ asi nesmysl. Doporučoval bych v tomto případě vynášet v grafu raději hodnotu mediánu, která bude asi blíže realitě než průměr. (str. 29)
- V rámci porovnávání hmotností nymf i dospělců je zmíněno, že doba přísátí klíšťat byla shodná, není však uvedeno, jak dlouhá tato doba byla? (str. 30 a 31)
- Podobně při studiu aktivity nymf při vyhledávání hostitele je zmíněno, že nebyl nalezen statistický rozdíl v rychlosti. Není však uveden čas, za který klíšťata zdolala připravenou dráhu v aréně? (str. 32)
- Na obr. 10 nejsou na ose y uvedena procenta, jak by mělo podle popisku být. (str. 34)



- V rámci cílů práce je posledním bodem „Zhodnocení možnosti využití zjištěných výsledků pro prevenci před získáním Lymeské boreliózy“. Jediným takovým zhodnocením, které jsem v práci našel je tvrzení (dle mého názoru situaci zjednodušující), že boreliemi infikovaní jedinci se budou vyskytovat převážně v místech osvětlených sluncem (str. 39). Fototaxe byla sledována v časovém intervalu 1 hodiny. Uvedené tvrzení by bylo na místě, kdyby autorka podobná data získala i v delších časových intervalech osvětlení. Prováděla autorka takové experimenty?
- V závěru diskuze autorka zmiňuje, že práce přispěla dalšími informacemi, které by se daly v případě člověka využít tak, aby bylo riziko napadení infikovaným klíštětem co nejmenší. (str. 39) Mohla by autorka konkrétně zmínit, co tím měla na mysli?
- Z dosažených výsledků je možné vyvozovat, že infekce boreliemi stěžuje klíštěti život ve smyslu nalezení hostitele a vlastního přisátí. Myslí si autorka totéž? Pokusila by se autorka navrhnout experiment, ve kterém by tuto teorii ověřila?

Práci doporučuji k obhajobě. Vzhledem k množství nepřesností v textu a chybějícím údajům zejména ve výsledkové části ji doporučuji hodnotit stupněm **velmi dobře**.

V Brně, 26. 5. 2014

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.